

① RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

⑪ N° de publication : **2 602 679**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

⑫ N° d'enregistrement national : **86 11769**

⑬ Int Cl⁴ : A 61 K 37/02, 37/28; C 12 P 21/06.

⑫ **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

⑭ Date de dépôt : 14 août 1986.

⑮ Priorité :

⑯ Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOP « Brevets » n° 7 du 19 février 1988.

⑰ Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑱ Demandeur(s) : *Etablissement public dit : INSTITUT
NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDI-
CALE (INSERM). — FR.*

⑲ Inventeur(s) : Dominique Pierre Henri Bataille, Ariane
Mallat, Michel Paul Dufour, Catherine Pavoine, Sophie
Lotersztajn et Françoise Pecker.

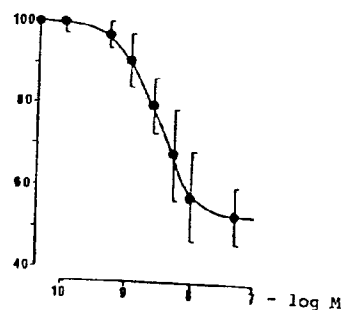
⑳ Titulaire(s) :

㉑ Mandataire(s) : Cabinet Nony et Cie.

㉒ Nouvelles compositions pharmaceutiques renfermant comme principe actif régulateur du mouvement des ions calcium un fragment du glucagon, et préparation d'un tel fragment.

㉓ Composition pharmaceutique utile notamment comme ré-
gulateur du mouvement des ions calcium, renfermant comme
principe actif au moins un peptide choisi parmi le fragment 18-
29 du glucagon, le fragment 19-29 du glucagon et les dérivés
de ces fragments dans lesquels les groupements amino et
carboxyle terminaux sont protégés par un groupement protec-
teur usuel compatible avec une utilisation pharmaceutique; et
préparation desdits fragments par hydrolyse enzymatique du
glucagon.

Activité de transport
AT₁-dépendant des ions
calcium.



FR 2 602 679 - A1

D

La présente invention a pour objet de nouvelles compositions pharmaceutiques qui renferment comme ingrédient actif, régulateur du mouvement des ions calcium, au moins un fragment du glucagon ou un dérivé dudit fragment.

5 On sait que le glucagon est une hormone polypeptidique sécrétée par les cellules bêta des îlots de Langerhans du pancréas.

La structure du glucagon est connue et est rappelée ci-dessous.

1
(H-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-

10 18 19 29
Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-OH)

Dans cette formule, les abréviations à 3 lettres sont conformes à la nomenclature recommandée pour les acides aminés.

15 Classiquement, il est admis que les effets du glucagon sont médiés par l'AMP cyclique. Cependant, il apparaît aujourd'hui que les effets de cette hormone sur l'homéostasie calcique se produisent indépendamment de la synthèse d'AMP cyclique. Ainsi, il a été démontré une inhibition par le glucagon de la pompe à calcium membranaire responsable de l'extrusion du calcium hors de la
20 cellule. Cette inhibition n'est pas liée à l'activation de l'adénylate cyclase; voir par exemple Lotersztajn et al., J. Biol. Chem., 259, 8195-8201 (1984).

On a maintenant découvert que, de façon surprenante, les fragments 18-29 et 19-29 du glucagon reproduisent cet effet du glucagon, et ce, à des
25 concentrations 100 à 1000 fois moindres. Il faut préciser que ces dérivés n'ont aucun effet sur l'activité adénylate cyclasique.

Les inhibiteurs des canaux calciques (nifedipine, cordium) sont particulièrement utilisés en thérapeutique dans le traitement de l'insuffisance coronarienne et de l'hypertension artérielle.

30 Dans le brevet français n°78.21686 (n° de publication : 2.398.051) l'utilisation comme réactifs biochimiques de divers fragments du glucagon, y compris les fragments 18-29 et 19-29, et leur préparation par voie synthétique, ont été décrites.

La présente invention a pour objet l'utilisation des fragments 18-29
35 et 19-29 du glucagon, de leurs mélanges et de leurs dérivés comme agents thérapeutiques dans le traitement des maladies cardio-vasculaires, en particulier dans le traitement des états de choc chez les patients sous bêta-bloquants, et plus généralement leur utilisation pour la préparation de médicaments régulateurs des mouvements des ions calcium. Lesdits fragments ou
40 leurs dérivés peuvent aussi être utilisés dans divers troubles hépatiques,

dans les cas où une modification de l'homéostasie calcique du foie pourra être d'un intérêt thérapeutique, en particulier pour stimuler la régénération hépatique.

L'invention a en particulier pour objet des compositions pharmaceutiques caractérisées par le fait qu'elles renferment comme principe actif, régulateur du mouvement des ions calcium, au moins un peptide choisi parmi le fragment 18-29 du glucagon, le fragment 19-29 du glucagon et les dérivés de ces fragments dans lesquels le groupement amine et/ou le groupement carboxyle terminaux sont protégés par un groupement protecteur usuel compatible avec une utilisation pharmaceutique.

Parmi les dérivés des fragments 18-29 et 19-29, on citera en particulier ceux dans lesquels le groupement amino terminal est protégé par un groupement acyle (par exemple acétyle) ou hydrocarbyloxycarbonyle (en particulier aralkoxycarbonyle ou alkoxycarbonyle, par exemple benzyloxy-carbonyle, tertibutyloxycarbonyle, etc...).

On citera également les dérivés dont le groupement carboxyle terminal est protégé sous forme d'amide, d'ester (alkyl-ester, benzyl-ester p-nitrobenzyl-ester, etc...) ou d'hydrazide (carbobenzoxyhydrazide, t-butyloxy-carbonyl-hydrazide, trityl-hydrazide, etc...).

Dans les compositions pharmaceutiques de l'invention, le fragment 18-29 et/ou 19-29 et/ou leurs dérivés sont généralement présents à raison de 0,5 à 50% en poids.

Les compositions pharmaceutiques de l'invention contiennent un véhicule permettant une utilisation par voie injectable : intraveineuse, intramusculaire ou sous-cutanée. Le véhicule est de préférence le sérum physiologique.

Bien entendu, la composition peut être présentée sous forme lyophilisée, à diluer au moment de l'emploi.

La posologie peut varier suivant le type et l'intensité de l'effet thérapeutique recherché, la gravité de l'affection et la voie d'administration utilisée. Elle est généralement de l'ordre de 1 à 500µg chez l'adulte.

L'invention a également pour objet l'utilisation, dans la préparation d'un médicament inhibiteur des mouvements calciques, d'un peptide ou d'un mélange de peptides ou d'un de leurs dérivés tels que définis précédemment.

L'invention a également pour objet un nouveau procédé de préparation des fragments 18-29 et 19-29, de leurs mélanges et de leurs dérivés. Ce procédé est principalement caractérisé par le fait que l'on hydrolyse le glucagon à l'aide d'une protéase spécifique des résidus basiques, pendant un temps suffisant pour obtenir le fragment 18-29 et/ou 19-29 que l'on purifie,

selon les méthodes usuelles de la séparation des peptides, les fragments ou mélanges de fragments recherchés et que, si désiré, on prépare selon les méthodes usuelles un dérivé correspondant par addition de groupements protecteurs aux extrémités amino et/ou carboxyle terminales. La protéase est notamment la trypsine.

Généralement, on fait agir la protéase à un pH de 7 - 8, et à une température de 25 - 40°C (de préférence vers 37°C).

Les fragments peptidiques sont séparés par exemple par chromatographie.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans toutefois la limiter.

EXEMPLE 1

Dans cet exemple, on a utilisé comme modèle la pompe à calcium de la membrane plasmique de l'hépatocyte et on a étudié les deux paramètres cinétiques qui la définissent : l'activité ATP-dépendante de transport des ions calcium et l'activité $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ ATPasique.

Inhibition par le glucagon-(19-29) du transport ATP-dépendant des ions calcium dans des vésicules de membranes plasmiques de foie.

On prépare des vésicules de membranes plasmiques à partir de foies de rats femelles Wistar albinos selon la méthode décrite par Prpic et al. J. Biol. Chem., 259 1382-1385 (1984).

Le transport ATP-dépendant des ions Ca^{2+} est mesuré selon Lotersztajn et al., J. Biol. Chem., 259, 8195-8201 (1984).

L'addition de glucagon-(19-29) dans le milieu d'incubation, à des concentrations variant de 0 à 50nM a permis d'observer une inhibition dose-dépendante du transport ATP-dépendant des ions calcium. On obtient une inhibition maximale de 40 à 60% avec 10nM de glucagon -(19-29), la demi-inhibition maximale étant observée pour $3 \cdot 10^{-3}$ nM de glucagon-(19-29).

La figure 1 représente, en ordonnées, l'activité de transport ATP-dépendant des ions calcium dans les préparations de vésicules de membranes de foie, mesurée en fonction de concentrations croissantes (en abscisses, reportées en-log M) de glucagon-(19-29). L'activité de transport est exprimée en pourcentage de l'activité observée en l'absence de glucagon-(19-29).

Les résultats représentent la moyenne de 5 expériences différentes.

Inhibition de l'activité $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ ATPasique des membranes plasmiques de foie purifiées par le glucagon-(19-29).

Les membranes sont préparées selon la méthode décrite par Neville, Biochim. Biophys. Acta, 154, 540-552 (1968) jusqu'à l'étape 11.

Les membranes sont préincubées à 4°C en présence de concentrations variables de glucagon-(19-29) dans un milieu 50mM Tris-HCl pH 8, 0,01% sérum albumine 870nM lactose. Après 10 minutes, l'activité $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ ATPasique est

déterminée selon Lotersztajn et al. (article cité ci-dessus).

Les résultats sont résumés sur le graphique de la figure 2 avec, en abscisses, les concentrations de glucagon-(19-29), reportées en $-\log M$, et en ordonnées l'activité $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ ATPasique exprimée en pourcentage de l'activité déterminée en l'absence de glucagon-(19-29). On observe une inhibition maximale de 15 à 25% pour 10nM de glucagon-(19-29), la moitié de l'inhibition maximale étant obtenue pour 0,25-1,25nM de glucagon-(19-29). Des études complémentaires ont montré que l'inhibition est due à une diminution de la vitesse maximale de la réaction, sans modification de l'affinité apparente de l'enzyme pour le calcium.

On sait que le glucagon natif provoque une inhibition maximale de 30 à 50% de l'activité $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ ATPasique et de l'activité de transport des ions calcium dans les membranes plasmiques de foie. Cependant, son affinité apparente pour la pompe à calcium n'est que de l'ordre de la micromole par litre ; voir Lotersztajn et al., article cité. Il apparaît donc que le glucagon-(19-29) est 1000 fois plus actif que le glucagon natif dans l'inhibition de la pompe à calcium. Pour vérifier la spécificité de l'action du glucagon-(19-29), l'activité $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ ATPasique a été étudiée en présence d'autres fragments de glucagon -(18-29), glucagon-(22-29) et glucagon-(1-21).

Les résultats sont résumés dans le tableau 1 ci-dessous:

TABEAU 1

Les résultats représentent la moyenne de 4 essais.

Effets de divers fragments du glucagon sur l'activité $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ ATPasique des membranes plasmiques de foie.					
	GLUCAGON-(19-29)	GLUCAGON-(18-29)	GLUCAGON	GLUCAGON-(22-29)	GLUCAGON-(1-21)
Ki (nM)	0,75±0,5	7,5±2,5	700±300	1000±300	10.000
% d'inhibition maximale	20±5	15±5	25±10	10±5	

Le glucagon-(1-21) provient des Laboratoires Novo et le glucagon-(22-29) de Peninsula Laboratories.

Le glucagon -(19-29) et le glucagon-(18-29) ont été préparés à partir du glucagon comme décrit ci-après.

On voit que le glucagon-(18-29) a une affinité pour le système 10 fois moindre que celle du glucagon-(19-29). Le glucagon-(22-29), avec une efficacité moindre, a une affinité pour le système comparable à celle du glucagon natif. Quant au fragment glucagon-(1-21), il n'a aucun effet sur la pompe à calcium. D'après la littérature, la molécule entière du glucagon est nécessaire pour obtenir l'activation complète de l'adénylate cyclase. De fait, lors de la présente étude, on n'a observé aucune action des dérivés 18-29 et 19-29 sur l'activité adénylate cyclasique à des doses de 0 à 0,1mM.

Il résulte des études rapportées ci-dessus que le glucagon-(19-29) et le glucagon -(18-29) doivent être considérés comme des régulateurs spécifiques des mouvements calciques.

EXEMPLE 2 :

Préparation du glucagon-(19-29) et du glucagon-(18-29)

On utilise comme produit de départ du glucagon cristallisé de pancréas de porc (Novo, Danemark). On incube ce glucagon pendant 1 heure à 37°C, dans un tampon 50mM tris-HCl, 1mM CaCl₂, pH 7,5, avec de la trypsine traitée à la L-1-tosylamide-phényléthylchlorométhylcétone (ou TPCK : Sigma, USA) avec une proportion enzyme/substrat de 1/100, en poids. On porte ensuite à ébullition pendant 3 minutes, puis on effectue une séparation par chromatographie liquide haute performance à phase inversée (RP-HPLC) avec un débit de 1,5 ml/min, dans l'acide trifluoroacétique à 0,1%. Les peptides sont élués avec un gradient linéaire (0-50% en 50 minutes) d'acétonitrile contenant 0,05% d'acétate d'éthyle. Cette technique est analogue à celle décrite par Bataille et al. FEBS Lett., 146, 73-78 (1982). On détecte les peptides par absorption UV à 214 et 280nm. La pureté des fragments peptidiques a été vérifiée par comparaison de leur spectre UV avec les spectres théoriques, et aussi par analyse des amino-acides selon une technique analogue à celle décrite par Fleury et al. Anal. Biochem., 133, 330-335 (1983).

REVENDICATIONS

1. Composition pharmaceutique caractérisée par le fait qu'elle renferme comme principe actif, régulateur du mouvement des ions calcium, au moins un peptide choisi parmi le fragment 18-29 du glucagon, le fragment 19-29 du glucagon et les dérivés de ces fragments dans lesquels les groupements amino et carboxyle terminaux sont protégés par un groupement protecteur usuel compatible avec une utilisation pharmaceutique.

2. Composition pharmaceutique selon la revendication 1, caractérisée par le fait que le groupement amino terminal est protégé par un groupement acyle ou hydrocarbyloxy-carbonyle.

3. Composition pharmaceutique selon la revendication 2, caractérisée par le fait que le groupement amino terminal est protégé par un groupement acétyle, un groupement benzyloxy-carbonyle ou un groupement tertio-butyl-oxy-carbonyle.

4. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée par le fait que le groupement carboxyle terminal est protégé sous forme d'amide, d'ester ou d'hydrazide.

5. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée par le fait qu'elle comprend de 0,5 à 50% en poids dudit peptide ou mélange de peptides ou de leurs dérivés.

6. Utilisation, dans la préparation d'un médicament régulateur des mouvements calciques, d'un peptide ou d'un mélange de peptides ou d'un de leurs dérivés, tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 4.

7. Procédé de préparation du fragment 18-29 du glucagon, du fragment 19-29 du glucagon, de leurs mélanges et de leurs dérivés, caractérisé par le fait que l'on hydrolyse le glucagon à l'aide d'une protéase spécifique des résidus basiques, pendant un temps suffisant pour obtenir le fragment 18-29 et/ou 19-29, que l'on sépare, selon les méthodes usuelles, les fragments ou mélanges de fragments recherchés et que, si désiré, on prépare selon les méthodes usuelles un dérivé correspondant par introduction d'un groupement protecteur du groupement amino terminal ou du groupement carboxyle terminal.

35

40

1/2

Activité de transport
ATP-dépendant des ions
calcium.

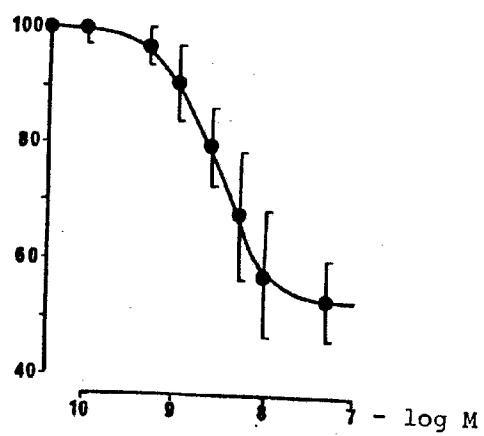


Figure 1

Activité $(\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+})\text{ATPasique}$

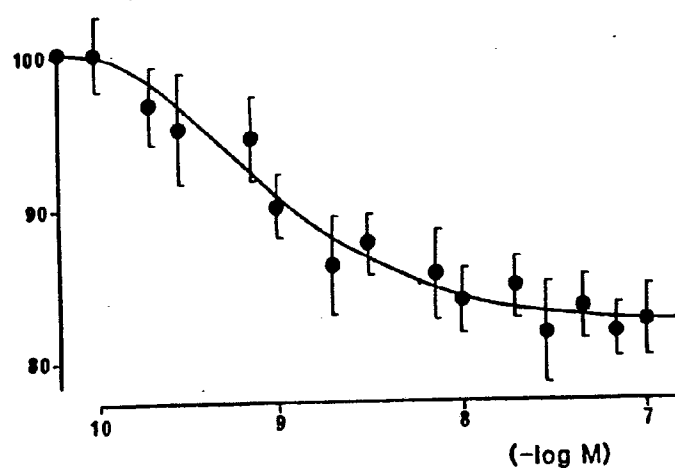


Figure 2

GLUCAGON FRAGMENT REGULATING CALCIUM ION MOVEMENT

Publication number: FR2602679

Publication date: 1988-02-19

Inventor: BATAILLE DOMINIQUE PIERRE HENR; MALLAT ARIANE; DUFOUR MICHEL PAUL, PAVOINE CATHERINE; LOTERSZTAJN SOPHIE, PECKER FRANCOISE

Applicant: INST NAT SANTE RECH MED (FR)

Classification:


- **International:** **C07K14/605**; A61K38/00; **C07K14/435**; A61K38/00; (IPC1-7): A61K37/02, A61K37/28, C12P21/06

- **European:** C07K14/605

Application number: FR19860011769 19860814

Priority number(s): FR19860011769 19860814

Also published as:

 WO8801174 (A1)

[Report a data error here](#)

Abstract of **FR2602679**

Pharmaceutical composition useful particularly as regulator for the movement of calcium ions, containing as active principle at least one peptide selected amongst the fragment (18-29) of glucagon, the fragment (19-29) of glucagon and the derivatives of said fragments wherein the terminal carboxyl and amino groups are protected by a conventional protector group compatible with a pharmaceutical utilization.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide